クロルテトラサイクリンの化学的定量法—I.*

— 新 螢 光 定 量 法

富山 哲夫・米 康夫・北原 慶子

(1959 年 5 月 21 日受理)

A CHEMICAL METHOD FOR DETERMINATION OF
CHLORTETRACYCLINE—I.

A NEW FLUOROMETRIC METHOD

Tetuo TOMIYAMA, Yasuo YONE and Keiko KITAHARA**

Since chlortetracycline (CTC)-containing ice is being widely used for keeping the freshness of trawler's catches in the western sea area of Japan, a practical field method for the determination of CTC incorporated in ice is needed for field test of concentration, distribution and destruction of the antibiotic in the ice.

The method herein reported is based on a linear relationship between the chlortetracycline concentration and the intensity of fluorescence produced on irradiation of aluminum chelate of chlortetracycline with ultraviolet ray.

The method for the determination is as follows: To a 10 cc. aliquot of sample and each of standard solution series (1~5 mcg. per cc.) add 1 cc. of a 1% potassium alum ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) solution in M/2 acetate buffer of pH 4.6. Allow it to stand from 20 to 60 minutes at room temperature. Measure the fluorescence of the sample at $500m\mu$ which is produced with excitation light of $365m\mu$ or $436m\mu$. Similarly, measure the fluorescence of the alum-containing standard solutions, subtract blank value from each measured intensity of fluorescence, and draw a standard curve by plotting the intensity of fluorescence against the concentration of CTC. A representative standard curve is shown in Fig. 9. From the standard curve read the CTC concentration of the sample solution corresponding to the intensity of fluorescence from which blank value is subtracted.

I. 緒 言

クロルテトラサイクリン (CTC と略記) を含む氷が以西底引漁獲物の鮮度保持に現在広く使用されている。これに対し厚生省は氷中の CTC 量は 5 ppm 以下であることを規定しているので、氷中の CTC 量の簡易な化学的定量法が食品衛生の立場から要求されている。

著者の 1 人 (富山) はアルミ鍋で煮沸し冷却した水道水中で CTC が紫外線照射により黄金色の螢光を放つことを偶然に観察したので、この螢光分析によつて CTC の定量が可能ではないかと想像して本研究を行つた。分光光度計を用いて先づ種々の金属イオンによる螢光度の差異をみたところ、アルミニウムイオンの存在によつて CTC の螢光が最も強く現われるのを見出したので、定量法の決定に必要な種々の条件を検討した結果、一新定量法を決定することができた。

II. 定 量 法

1. 試薬、標準液および試料の調製

- a. 試薬: 1%カリ明礬液: 1g のカリ明礬 $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ を pH 4.6 の M/2 醋酸緩衝液 100 cc

* 本研究の大要は 1958 年 4 月東京における日本水産学会年会で報告した。

** 九州大学農学部水産化学教室 (Lab. Fish. Chem. Fac. Agr. Kyushu Univ.).

(印刷費負担)

にとかす。この緩衝液はつぎのようにして簡単に調製できる。先ず約 1 M 醋酸の 50 cc をフェノールフタレインを指示薬として約 1 M 苛性ソーダで中和し滴定値を求める。この滴定値の半量を前記 1 M 醋酸の 50 cc に加え、全量を 100 cc に定容すれば pH 4.6 を示す。

b. CTC の標準原液: クロルテトラサイクリン塩酸塩の 100 mg を蒸留水にとかし 200 cc に定容する。この液 1 cc を小試験管に入れ凍結する。この状態に保存すれば約 2 ヶ月は変化しない。

2. 定量装置

本研究では日立製作所製分光光度計 EPU-2 型を使用し、10 mm の蛍光測定用キュベットを用いた。第一次フィルターには 365 m μ 或いは 436 m μ のものが使用できるが、iso-CTC の混在する恐れのある場合には後者のフィルターを用うべきである。

3. 定量操作

1 cc の CTC 標準原液を蒸留水で 100 cc に希釈し 5 mcg/cc の液をつくる。これを更に蒸留水で希釈して 4, 3, 2 および 1 mcg/cc の標準系列をつくる。これらの標準液 10 cc および試水 10 cc に 1 % カリ明礬試薬 1 cc ずつをそれぞれ混和し、20 分放置後よく攪拌してから蛍光測定用キュベットにいれ、365 m μ 或いは 436 m μ 附近の励起光線を照射して生ずる 500 m μ の蛍光を分光光度計で測定する。分光光度計の同一感度の条件で測定した標準液の蛍光から濃度対蛍光の関係を示す標準曲線を描き、これを用いて試料の CTC 濃度を求める。

本定量で注意すべきことは水洗で除き難い Al-キレートがキュベットに附着して盲検値が見掛け上大きくなることがある。したがってキュベットはクエン酸・塩酸混液でしばしば洗滌せねばならない。

なおこれらのカリ明礬試薬を加えた標準系列および試水は室温で 3 時間は一定の蛍光を示す。その後次第に増加し、室温では 2 日、冷蔵庫 (5 $\sim$ -3 $^{\circ}$ C) 内では 2 週間は初めの蛍光の 1.0 $\sim$ 1.3 倍の蛍光を保っている。

III. 実験結果および考察

1. CTC とキレートして蛍光を発する金属

CTC とキレートして蛍光を放つ金属を定性的に探したところ、Al, Ba, Mg, Ca, Zn, Th, Hg, Mn, Pb および W にこの性質のあることを知った。これらの金属のうち強い蛍光を放つ Al, Mg および Th について再検討した。金属が CTC とキレートする場合には金属と CTC との比は多くの場合 1 原子: 1 分子であり、またこのキレートの安定度はその溶液の pH によつて異なる

Table 1. Relative intensity of fluorescence of metal-CTC chelates*

Kinds of salt	%	max. (m μ)	Intensity of fluorescence	
			pH 4.6	pH 6.0
AlK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	.00496	500	41 (48)	77 (26)
Al ₂ O(CH ₃ COO) ₄ ·4H ₂ O	.00198	500	12 (13)	15
Th(NO ₃) ₄ ·4H ₂ O	.00580	510	12 (6)	6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	.00258	510	1	2
PbCl ₂	.00296	500	0	1
Pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O	.00396	500	2	2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	.00154	470	1	5
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	.00353	470	6	6

* 10 cc. of CTC (5 mcg./cc.) in M/16 acetate buffer (pH 4.6) plus 1 cc. of metal salt solution.

Values were obtained shortly after mixing with the reagent, and values in parenthesis were those after a 20-minute standing.

ると報告した石館・坂口両氏¹⁾および坂口氏等²⁾の研究にもとずき、CTC の一定量に対する各種金属の添加量の割合およびそれら溶液の pH を一定にして、各金属キレート化合物の蛍光度を比較した。その結果は Table 1 に示すようで、pH 4.6 および pH 6.0 のいずれの場合にもアルミニウムとのキレート化合物が最も強い蛍光を放ち、ついで Th, Mg, Zn の順であつた。しかし解離度の大きいキレート化合物は 1:1 の比以上の金属を加えなければ CTC は完全にキレートしない

Fig. 1. Fluorescence curves for metal chelates of CTC and iso-CTC.

Experimental conditions for preparing chelates were as follows: CTC + Al, 10 cc. of CTC (5mcg./cc.) plus 1cc. of 1% Alum in M/2 acetate buffer; for CTC or iso-CTC+Mg, 10 cc. of CTC or iso-CTC plus 4g. of $MgSO_4$ and 300 mg. $CH_3COO-Na$; for CTC or iso-CTC+Th, 10 cc. of CTC or iso-CTC plus 1cc. of 0.1% Th $(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$ in M/2 acetate buffer.

し、またキレート化合物が最も強い蛍光を発する pH は金属の種類によつて異なり、また各種金属キレート化合物の最大蛍光波長も金属の種類で異なる。それ故に、Al, Mg, および Th について最大の蛍光を発する条件を求め、この条件における蛍光度を分光光度計を用いて測定したところ、Fig. 1 に示すように Mg の蛍光は Al のその約 1/1.7, Th は Al の約 1/34 であった。

2. CTC および CTC 分解物の蛍光曲線

本反応を水中の CTC の定量へ発展させるためには、CTC と Al とのキレート化合物の蛍光曲線を知ること、また CTC の熱およびアルカリによる分解物である iso-CTC、水中の Fe^{3+} および Cl_2 による酸化分解物等が Al^{3+} の存在でどのような蛍光曲線を示すかを知らねばならない。因て 5 mcg/cc の CTC、或いは CTC の分解液を定量法にしたがつて処理し、30 分後に分光光度計を用いてそれぞれの蛍光曲線を画いた結果は Fig. 2 に示すようである。すなわち CTC の Al キレート化合物の最大蛍光波長は 500 $m\mu$ であり、 Fe^{3+} および Cl_2 で酸化した分解物の 500 $m\mu$ の蛍光度はそれぞれ CTC の 6% および 2% であった。他方 iso-CTC の 500 $m\mu$ における蛍光は 8% を示したが、436 $m\mu$ の第一次フィルターを用いると、この値は Fig. 3 に示すように 4% と減少した。

5 ppm 以下では CTC 濃度および iso-CTC 濃度と蛍光度との間にはそれぞれ Figs. 9 および 4 に示す

Fig. 2. Fluorescence curves for CTC and decomposed CTC in the presence of Al^{3+} .

Experimental conditions for preparing decomposed CTC were as follows: CTC + Fe^{3+} , CTC (5mcg./cc.) plus 20 ppm of Fe^{3+} ($FeCl_3$), measurement being made after 3-day standing at room temperature; CTC + Cl_2 , CTC (5mcg./cc.) plus Cl_2 (10 ppm), fluorescence being measured shortly after the addition.

Fig. 3. The effect of primary filter characteristic (436 $m\mu$, 365 $m\mu$) on fluorescence of CTC and of iso-CTC in presence of Al^{3+} .

--○-- CTC + Al
—○— iso-CTC + Al

Fig. 4. Relationship between concentration and fluorescence of iso-CTC in presence of Al^{3+} .

余り差がなかつた。したがって iso-CTC が存在する場合には Th キレートとして CTC を蛍光定量することは明かに不可能であり, Mg キレートとして蛍光定量することも困難であろう。

Table 2. Interference caused by presence of iso-CTC

Primary filter (mμ)	Wave length for measuring fluorescence (mμ)	Sample solution		Calculated		Found	
		CTC mcg./cc.	iso-CTC mcg./cc.	CTC mcg./cc.	% error	CTC mcg./cc.	% error
365	500	4	1	4.07	+ 2.0	4.15*	+ 4.2
		3	2	3.14	+ 4.7	3.28	+ 9.3
		2	3	2.20	+10.0	2.30	+15.0
		1	4	1.27	+27.0	1.47	+47.0
436	500	4	1	4.04	+ 1.0		
		3	2	3.08	+ 2.7		
		2	3	2.12	+ 6.0		
		1	4	1.15	+15.0

Fig. 5. The effect of pH on the fluorescence.

ように直線関係があるので, もし水中の 5 ppm の CTC が破壊して 4, 3, 2 および 1 ppm に減じ, その分解物がすべて iso-CTC であったとした場合, 本定量法値のもつ誤差は容易に算出できる。365 mμ の第一次フィルターを用いた場合の算出誤差と実験的に求めた誤差とは Table 2 に示すように近似しており, CTC が iso-CTC に比して少ない場合はかなりの誤差を招く。しかし 436 mμ の第一次フィルターを用いた場合にはこの誤差は小さい。実際に製造直後或いは 30 日経過した CTC 氷には iso-CTC は極めて少量 (1 ppm 以下) であったから, 定量値にはほとんど影響しないであろう。

つぎに Th および Mg と CTC のキレート化合物が最も強い蛍光を発する条件を求め, その条件における CTC および iso-CTC の蛍光曲線を画いた。その結果は Fig. 1 に示した通りで, Th 或いは Mg のキレート化合物の蛍光が弱いために, iso-CTC の蛍光との間に

以上の結果から CTC の Al キレートが長波長の紫外線照射により蛍光を放つ性質を利用して新定量法を確立する見透しがえられたので, つぎに定量の基礎条件を検討した。

3. 蛍光度におよぼす pH の影響

SEREMBE³⁾ は CTC そのものの蛍光は pH によつて変化すると報告している。坂口氏等によると CTC の金属キレートの安定度はその溶液の pH により異なる^{1,2)}。したがって最も強く, 且つ安定な蛍光を与える pH を知るために, 醋酸緩衝液で pH を数段階に調節した CTC 液に pH を同様に調節したカリ明礬試薬を加え, 20~60 分後に蛍光を測定した。Fig. 5 にみられるように pH 5.5 以下では測定中に蛍光はほとんど変動しなかつたが, pH 6.0 以上では急激に減少した。これは Al キレート化合物が pH 6.0 以上では難溶なために溶液から析出してくるためであろう。以上の結果にもとづいて試料の pH を 4.6 に調整することにした。

4. 試薬添加後の蛍光の時間的变化

1~5 mcg/cc の CTC 液にカリ明礬試薬を添加した後、1 時間室温に放置中における蛍光度の変化を分光光度計を用いて測定した。その結果は Fig. 6 に示すようであつて、蛍光は 2~5 分後に最高値を示し、その後次第に減少して 20 分後より一定値に達した。したがつて分光光度計による蛍光の測定は試薬添加後 20 分以後に行うべきである。なおこのカリ明礬試薬を添加した CTC 液を室温 (25~28°C) および冷蔵庫 (0~5°C) に長時間放置して蛍光の変化を分光光度計を用いて測定したところ、Fig. 7 に示すように、い

Fig. 6. The effect on the fluorescence of the time of standing after the addition of the reagent.

Fig. 7. The change in the fluorescence with time of standing for long duration.

○ at room temp., ① in refrigerator

Fig. 8. The effect of amount of the alum reagent on the fluorescence.

ずれの場合も 3 時間内はほとんど一定の蛍光を示したが、その後次第に蛍光が強くなり、室温に放置した場合は 22 時間後に、冷蔵庫に放置した場合は 70 時間後に最高値を示した。その時のそれぞれの蛍光は 30 分後の各蛍光を 100 とすると 129 および 127 であつた。その後の蛍光はいずれの場合にも次第に減少した。

5. 試薬の添加量と蛍光の強さ

CTC 液に加えるカリ明礬試薬の量と蛍光度との関係を求めた結果は Fig. 8 に示す通りで、0.4 cc 以上では添加量を増しても蛍光度の変化は少なかった。したがつて本定量法では 10 cc の試水に対し 1% カリ明礬試薬 1 cc を添加する割合とした。

6. CTC 濃度と蛍光度との関係

以上の基礎実験の結果、最大蛍光を示すための条件が分つたので、それらの最適条件下で種々の濃度の CTC が Al^{3+} の存在で放つ蛍光と CTC 濃度との関係を求めた。なおこの場合に CTC を蒸留水に溶解し

Fig. 9. Relationship between CTC concentration and fluorescence of CTC- Al -chelate.

○ CTC in distilled water, ① in tap water containing carboxymethylcellulose, $Na_2S_2O_3$ and NaCl.

Table 3. Data for a standard curve

CTC mcg. per cc.	Fluorescence reading					Average, ± stand. deviation	Calc.
8	100	102	103	102	107	102.8 ± 2.6	103.1
7	93.2	93.0	95.1	93.0	93.1	93.5 ± 0.9	90.7
6	76.5	75.5	77.6	76.2	76.0	76.4 ± 0.8	78.3
5	67.0	66.2	65.0	66.2	66.5	66.2 ± 0.7	65.9
4	51.3	52.0	51.0	48.0	55.0	51.5 ± 2.5	53.5
3	41.1	41.2	41.6	39.9	40.2	40.8 ± 0.7	41.1
2	29.2	30.5	29.5	30.4	30.1	29.9 ± 0.6	28.7
1	17.9	17.0	16.0	18.1	18.2	17.4 ± 0.9	16.3
0	3.3	3.3	3.8	3.0	3.6	3.4 ± 0.3	3.9

た液についてだけでなく、カーボキシメチルセルローズ (CMC), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ および NaCl を市販の CTC 水と同じ割合に水道水に溶解したものについても測定した。その結果は Fig. 9 および Table 3 に示す通りで、いずれの場合にも CTC 濃度と螢光度との間には 8 mcg/cc 以下では直線関係がみられた。なお蒸溜水と CMC, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ および

NaCl を添加した水道水との間には差が認められなかった。CTC 濃度 (x) に対する螢光度 (y) の回帰直線の方程式を Table 3 に示した値から求めると $y-53.5 = 12.4 (x-4)$ となり、また回帰係数の 99% 信頼限界は 12.4 ± 0.35 となる。

IV. 総 括

CTC とアルミニウムとのキレート化合物の溶液に 360 $m\mu$ および 436 $m\mu$ 附近の励起線を照射すると黄色の螢光を放出するので、これを利用した CTC の一新螢光定量法を考案した。結果を要約するとつぎの通りである。

1. 螢光を放つ CTC の金属キレート化合物の中でアルミニウムが最も強い螢光を示した。
2. CTC のアルミニウムキレート化合物の最大螢光波長は 500 $m\mu$ であった。
3. 安定な螢光を示す pH は 5.5 以下であり、本法では pH 4.6 を選んだ。
4. 試薬として加えるカリ明礬の濃度は一定量以上存在すれば、螢光度には僅かしか影響しなかった。
5. 試薬を添加してから螢光が安定するのは 20 分から 3 時間の間であった。
6. CTC の塩素或いは鉄による分解物の存在は定量に影響しないが、iso-CTC の多量の存在は定量を阻害する。436 $m\mu$ の第一次フィルターを用いると、この阻害を小さくすることができる。

本研究は文部省科学研究費および日本レダリーの支援によつて遂行した。また実験には森健児、豊田恭平および岩崎富生の各位の助力を受けた。ここに各方面の厚意と協力とに謝意を表する次第である。

文 献

- 1) ISHIDATE, M., and SAKAGUCHI, T.: *Pharm. Bull.* (Tokyo), **3**, 147 (1955).
- 2) SAKAGUCHI, T., TOMA, M., YOSHIDA, T., OMURA, H. and TAKASU, H.: *Pharm. Bull.* (Tokyo), **6**, 1 (1958).
- 3) SEREMBE, M.: *C. A.*, **46**, 1152. *C. A.*, **50**, 1970.